

doi : 10. 16473/j. cnki. xblykx1972. 2020. 05. 013

蔗糖浓度对百子莲‘Big Blue’体胚成熟效果的影响*

岳建华^{1,2}, 王苗¹, 董艳³, 张华¹, 刘松虎^{1,2}, 张琰^{1,2}

(1. 信阳农林学院 园艺学院, 河南 信阳 464100;

2. 信阳市大别山区园艺植物遗传改良重点实验室, 河南 信阳 464100;

3. 信阳农林学院 林学院, 河南 信阳 464100)

摘要: 揭示蔗糖浓度对体胚成熟诱导数量及生理特性的影响, 为百子莲体胚发生体系优化提供参考。以百子莲‘Big Blue’小花梗起源的胚性愈伤组织(EC)为试材, 研究了蔗糖浓度(3% ~6%)对成熟胚数量、生理特性的影响, 并根据相关性分析结果进行了生理指标验证。结果表明, 蔗糖用量显著影响百子莲体胚成熟诱导效果, 胚状体数量随蔗糖浓度的增加呈单峰曲线变化, 其中4%蔗糖效果较佳。蔗糖浓度显著调节体胚成熟诱导糖代谢、内源激素代谢、氧化胁迫平衡。总糖、淀粉含量对体胚诱导相对重要, 在4%蔗糖处理下最高, 其中总糖与成胚数显著相关($P < 0.05$), 相关系数为0.973, 淀粉与成胚数相关系数为0.769; 麦芽糖含量随蔗糖浓度增加呈单峰曲线变化, 在5%蔗糖处理下较高; 蔗糖含量则与培养基蔗糖用量趋势相反。结合态 IAA、GA₄、CTK、ABA 等内源激素与蔗糖浓度、胚状体数量关系密切, 含量随蔗糖浓度增加呈单峰曲线变化, 其中结合态 IAA 含量在4%蔗糖处理下最高, 而 GA₄、CTK、ABA 在5%蔗糖处理下达最高水平。内源 IAA 是调节百子莲体胚诱导的关键激素, 结合态 IAA 与自由态 IAA 变化趋势相反, 其中结合态 IAA 与成胚数相关系数为0.977, 为显著相关($P < 0.05$); GAs、GA₃与成胚数的相关系数为-0.708、-0.649, GAs 含量增高对体胚成熟诱导不利; 内源、外源 ABA 均可显著促进体胚诱导数量; 适度氧化胁迫可促进体胚成熟诱导, H₂O₂、POD 对百子莲体胚诱导相对重要。

关键词: 百子莲; 蔗糖浓度; 成熟胚诱导; 生理特性

中图分类号: S 682.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1672-8246 (2020) 05-0081-10

Effects of Sucrose Concentrations on Somatic Embryo Maturation in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* ‘Big Blue’

YUE Jian-hua^{1,2}, WANG Miao¹, DONG Yan³, ZHANG Hua¹, LIU Song-hu^{1,2}, ZHANG Yan^{1,2}

(1. College of Horticulture, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang Henan 464100, P. R. China;

2. Key Laboratory of Horticultural Plants Genetic Improvement of Dabie Mountain, Xinyang Henan 464100, P. R. China;

3. College of Forestry, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang Henan 464100, P. R. China)

Abstract: The revelation of physiological mechanisms affected by sucrose concentration in somatic embryo maturation is important, which is helpful for the procedural optimization in this process. In this study, pedicel originated embryonic callus(EC) was employed as test materials in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* ‘Big Blue’, and EC was incubated in solid medium contained 3% -6% sucrose, then the mature somatic embryo number and physiological

* 收稿日期: 2020-04-11

基金项目: 河南省科技攻关计划项目(172102110263), 河南省基础与前沿研究计划(162300410181), 信阳农林学院青年教师科研基金(201701014), 信阳农林学院园艺专业综合改革试点建设项目(ZYZHGG201803)。

第一作者简介: 岳建华(1982-), 男, 讲师, 博士研究生, 主要从事园林植物发育生物学研究。E-mail: jhyues@163.com

通信作者简介: 张琰(1968-), 男, 教授, 硕士生导师, 主要从事园艺植物栽培研究。E-mail: zhy8010878@163.com

indexes were evaluated. Furthermore, correlation analyses between somatic embryo number and physiological data were conducted, and the effects of key indicators were validated. The results showed that the sucrose concentration had a significant effect on the somatic embryo induction quantity, and the embryoid number showed a single peak curve with the increase of sucrose concentration, among which 4% sucrose had a better effect. Sucrose concentration regulated sugar metabolism, endogenous hormone metabolism, and oxidative stress balance during somatic embryo induction process. The contents of total sugar and starch were relatively important for somatic embryo induction, which was the highest with 4% sucrose treatment. The correlation coefficient between total sugar and somatic embryo number showed a significantly positive correlation ($0.973, P < 0.05$), and the correlation coefficient between starch and somatic embryo number was 0.769. The maltose content also showed a single peak curve with the increase of sucrose concentration, which was higher with 5% sucrose treatment. However, the sucrose content in plant tissue was opposite to that in the medium. Endogenous hormones including binding IAA, GA₄, CTK, ABA were closely related to sucrose concentration and embryoid number, and the content of these endogenous hormones changed with the increase of sucrose concentration, and showed a single peak curve. Among which the binding IAA content reached the highest level with 4% sucrose treatment, while GA₄, CTK, ABA content reached the highest level with 5% sucrose treatment. Endogenous IAA was proved the key hormone that regulated somatic embryo induction in *A. praecox*. The changing trend of binding IAA was opposite to that of free IAA, and the correlation coefficient between binding IAA and embryo number was 0.977, which had a significantly positive correlation ($P < 0.05$). The correlation coefficients between GAs and GA₃ and the number of somatic embryo was -0.708 and -0.649, respectively. The increase of GAs content is unfavorable to somatic embryo induction. Both endogenous and exogenous ABA promoted somatic embryo maturation considerably. A moderate stress level promoted somatic embryo induction efficiency, H₂O₂ and POD were relatively important for somatic embryo induction in *A. praecox*.

Key words: *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis*; sucrose concentration; mature somatic embryo induction; physiological characters

百子莲‘Big Blue’(*Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* ‘Big Blue’)又称蓝百合,为百子莲科(Agapanthaceae)百子莲属(*Agapanthus*)单子叶多年生草本花卉,原产于南非南部^[1]。国内于2000年引种后,在其生物学特性^[2]、株型^[3]、开花^[4]等领域进行了较系统的研究。该物种为蓝色大花品种,观赏价值高,抗逆性强,发展前景广阔,但花前成熟期长达3~4年,目前种子、分株繁殖等方式均不能满足市场需求。

体细胞胚胎发生(somatic embryogenesis, SE)是植物组织培养再生途径之一,是优良种质资源快繁、基因改良的良好操作平台^[5]。胚性愈伤组织(embryogenic callus, EC)在不含外源生长素类物质的培养基上可发育形成类似成熟胚胎的结构,并进一步发育成新的植株。SE体系繁殖效率高,性状一致,不受季节限制,但由于机制及技术的复杂性,目前百子莲SE体系尚未能实现产业化应用。

糖作为碳源,为可植物细胞提供碳骨架,为呼吸代谢提供底物与能源,并维持胞内渗透势,是植

物离体培养的重要因素^[6-7]。不同植物、不同离体培养阶段对碳源的需求不同^[8]。植物组织培养一般采用蔗糖、麦芽糖、果糖、葡萄糖为碳源,其中蔗糖最为常用^[6]。在山核桃(*Carya cathayensis*)、桃叶卫矛(*Euonymus europaeus*)体胚诱导实验中,蔗糖的效果优于其他碳源^[6,9]。

蔗糖用量是影响离体培养效果的关键因子^[6]。通常在一定范围内(3%~6%),随着蔗糖浓度的升高,体胚诱导率呈先升后降的趋势^[10]。其中3%蔗糖最为常用,例如野百合(*Lilium brownii*)^[11]、金钗石斛(*Dendrobium nobile*)^[12]、仙茅(*Curculigo orchoides*)^[13]等组培和体胚体系。中间锦鸡儿(*Caragana intermedia*)愈伤诱导、丛芽诱导较佳碳源为2.5%蔗糖,生根阶段则为2%^[14]。白刺花(*Sophora davidii*)^[15]、鸢尾(*Iris tectorum*)^[16]和甜瓜(*Cucumis melo*)^[17]体胚诱导较佳蔗糖浓度分别为4%、5%和6%。综上,不同植物、不同发育阶段对蔗糖浓度的需求存在较大差别。

目前，百子莲 SE 体系常用 3% 蔗糖为培养基碳源^[18-19]，但对 SE 各阶段蔗糖用量缺乏系统研究，尤其是对体胚成熟诱导关键期的研究甚少。此外，蔗糖浓度调节体胚成熟效果的相关机制尚不明确，制约了体胚体系的优化。最近研究表明，碳水化合物和激素代谢、氧化胁迫对体胚发生的影响相对重要^[20-21]。本研究拟优化百子莲体胚成熟诱导期蔗糖使用浓度，并测定不同蔗糖浓度处理下体胚糖代谢、激素代谢、氧化胁迫等生理指标，探讨这些指标与百子莲体胚成熟诱导效果的关系，为初步揭示蔗糖浓度调节百子莲体胚发生的生理机制奠定基础，丰富植物体胚发生理论。

1 材料与方法

1.1 试验材料

百子莲‘Big Blue’购自南京市彩虹花卉公司，栽植于信阳农林学院校内实验基地。2018年5月17日，选取开花效果稳定的4年生植株未开裂的小花苞，以小花梗作为外植体进行愈伤组织诱导，方法参照何叶^[22]。愈伤组织进一步诱导得到单细胞起源的 EC，继代6个月后用于试验研究。选取的 EC 同步化状态较好，生长旺盛，颜色鲜黄，结构疏松。

1.2 试验方法

将 EC 接种到成熟胚诱导培养基上，培养基组分为 MS+ (3% ~ 6%) (w/v) 蔗糖+0.7% (w/v) 琼脂；pH 设为 5.8，121 °C 高压灭菌 25 min；60 °C 左右于超净工作台内分装至 90 mm×16 mm 玻璃培养皿，每皿 25 mL；冷却至室温后接种，每个培养皿接种 1.0 g 实验材料，平均分为 7 份。EC 接种于不同蔗糖浓度 (3%、4%、5%、6%) 的培养基上，每处理 5 皿，设 4 次重复。

1.3 培养条件

接种材料暗培养 7 d 后转至光下培养。培养室温度 25±2 °C，相对湿度 65% 左右，光照强度为 40 ~ 50 μmol/(m²·s)。

1.4 观察及计数

培养 40 d 后，进行胚状体数量统计。以形态完整，长轴尺寸大于 2 mm 的不透明胚状体计数，统计每团 EC 产生的胚状体数量。

1.5 激素、糖类、活性氧及保护酶测定

采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定糖类、激

素、活性氧与保护酶等生理指标，测定方法参照 Pradko^[23]，委托上海酶联生物科技有限公司测定。方法如下：称取 1.0 g 鲜样，加 2 mL 样品提取液，冰浴匀浆，转入 10 mL 试管；4 °C 提取上清，过 C-18 固相萃取柱；转入 5 mL 离心管，真空冷冻干燥，用样品稀释液定容；加标样及待测样，取标样稀释为梯度浓度 (含 0 μg/mL)，标样及待测样加入 96 孔酶标板，每孔 50 μL，样品设 3 次生物学重复；加一抗，将酶标板置入湿盒内 37 °C，30 min 后洗板，洗涤 4 次。加二抗，置于 37 °C 湿盒内 30 min。洗板后加底物显色，每孔加 50 μL、2 mol/L 硫酸终止反应；利用酶标仪依次测定标准物梯度浓度和各样品 490 nm 处的 OD 值，根据标准曲线计算样品含量或酶活性。

1.6 生理指标验证

根据不同浓度蔗糖用量处理下成熟胚数量、生理测定结果进行验证。对照培养基为 MS+4% (w/v) 蔗糖+0.7% (w/v) 琼脂；验证激素指标的培养基：对照培养基灭菌后，分别加入 1.0 mg/L 毒莠定 (Picloram, PIC)、1.0 mg/L N-(1-萘基)邻苯二甲酸 (N-1-Naphthyl Phthalamic Acid, NPA)、0.05 mg/L GA₄₊₇、0.05 mg/L 多效唑 (Paclobutrazol, PBZ)、1.0 mg/L 脱落酸 (Abscisic Acid, ABA)；验证碳源指标的培养基：MS+4% (w/v) 葡萄糖 (或麦芽糖)+0.7% (w/v) 琼脂。其他培养条件同上。设 4 次重复，30 d 后观察、计数。

1.7 数据分析

用 Excel 2016、GraphPad Prism 5、Adobe Photoshop 进行数据整理和作图，用 IBM SPSS Statistics 20 进行显著性检验 (Duncan, $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 蔗糖浓度对体胚成熟诱导效果的影响

从图 1 可知，不同蔗糖浓度对成胚诱导数量有显著影响。蔗糖浓度 40 g/L 比 30 g/L 成胚数量增加 23.28%，但未达到差异显著水平 ($P < 0.05$)，体胚发育较为成熟，部分形态学上端为绿色。蔗糖浓度 50 g/L、60 g/L 处理比 30 g/L 处理成胚数量分别显著减少了 36.10%、83.37% ($P < 0.05$)。随蔗糖浓度升高，胚状体数量逐渐减少，细胞团深黄色，呈颗粒状，不能诱导体胚的成熟发育。

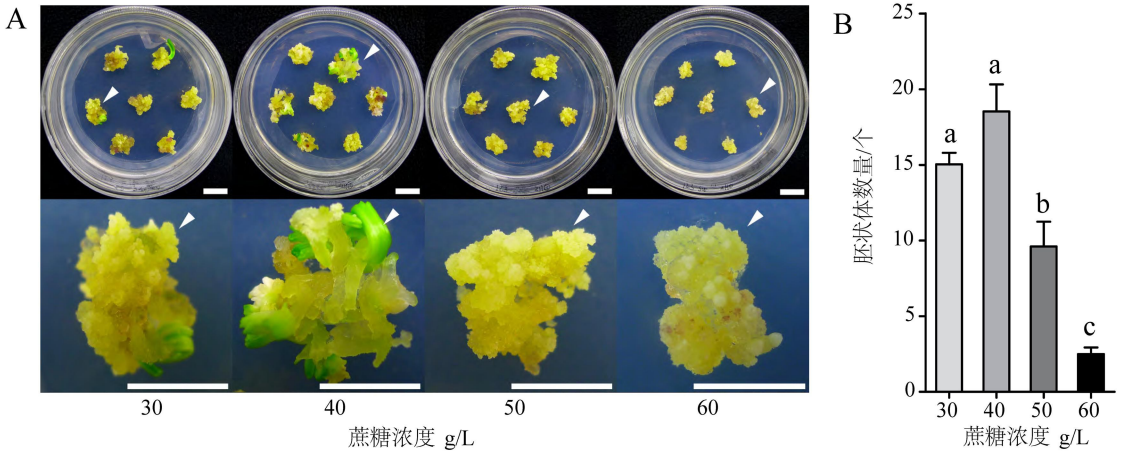


图1 不同蔗糖浓度对体胚成熟诱导效果的影响

注:A为蔗糖浓度调节成胚效果的形态分析,B为蔗糖浓度调节成胚数量的差异分析;标尺为1 cm, $n=4$,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 1 Effects of sucrose concentration on somatic embryo mature induction

2.2 蔗糖浓度对体胚成熟诱导糖代谢的影响

糖含量测定结果表明,在体胚诱导阶段,不同蔗糖用量对体胚糖代谢具有显著影响(图2)。总糖含量与成胚数量呈现出相似的变化规律,即40 g/L蔗糖处理下,总糖含量较高,30 g/L和50 g/L次之,60 g/L处理下总糖含量最低(图2A)。此外,淀粉含量在40 g/L蔗糖处理下达到各处理最高水平,对体胚诱导可能具有促进效果(图2B)。

蔗糖是培养基外源添加的碳源,内源蔗糖含量随处理浓度升高而降低,而60 g/L处理下蔗糖含量也处于较高水平(图2C)。果糖含量在30 g/L条件下较低,而40 g/L、50 g/L和60 g/L条件下较高,但3个处理差异不显著(图2D)。麦芽糖含量随蔗糖浓度升高呈现先升后降的变化规律,50 g/L时含量最高,显著高于其他处理($P < 0.05$,图2E)。葡萄糖含量随蔗糖浓度升高而增加(图2F)。

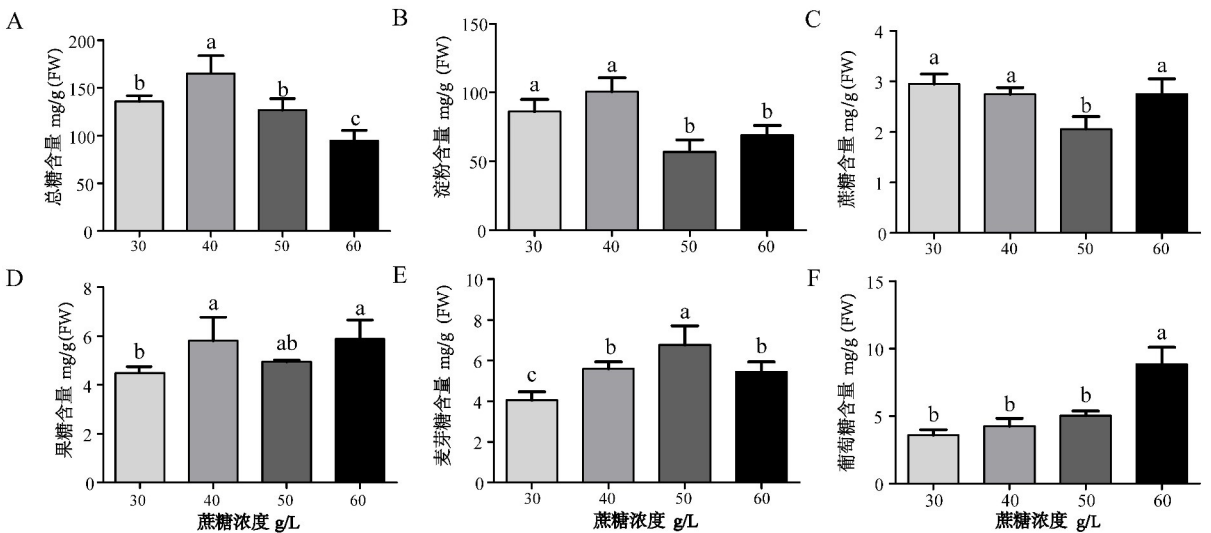


图2 不同蔗糖浓度对体胚成熟诱导糖代谢的影响

注:A为总糖含量,B为淀粉含量,C为蔗糖含量,D为果糖含量,E为麦芽糖含量,F为葡萄糖含量; $n=3$,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effects of sucrose concentration on sugar metabolism during somatic embryo mature induction stage

2.3 蔗糖浓度对体胚成熟诱导内源激素代谢的影响

如图3所示,在体胚诱导阶段,激素含量及代谢呈现出不同的变化规律。结合态吲哚乙酸(Indole Acetic Acid, IAA)含量在体胚发生过程中呈

单峰曲线变化规律,与成胚数量具有相似趋势,而游离态 IAA 含量与结合态 IAA 含量、成胚数量具有相反趋势,IAA 氧化酶与 IAA 变化规律相似(图3A、图3B、图3C)。为有效揭示赤霉素

(Gibberellin, GA) 在百子莲体胚发生中作用, 测定了 GAs 总量及活性组分 (GA_1 、 GA_3 、 GA_4), 其中 GAs、 GA_3 含量在 60 g/L 处理下最高, 总体上与成胚数量呈相反趋势 (图 3D、3F), GA_1 含量变化不显著 (图 3E), 而 GA_4 含量在 50 g/L 处理下最高, 且呈单峰曲线变化 (图 3G)。细胞分裂素 (Cytokinin, CTK) 含量也呈现单峰曲线变化规律,

在 50 g/L 处理下达到最高水平 (图 3H)。油菜素甾醇类 (Brassinosteroids, BR) 受蔗糖浓度调控较显著, 含量随蔗糖用量增加而降低 (图 3I)。脱落酸 (Abscisic acid, ABA) 含量呈现单峰曲线规律, 在 50 g/L 处理下最高 (图 3J)。乙烯含量受蔗糖用量影响不显著 (图 3K), 40 g/L 蔗糖处理下茉莉酸 (Jasmonate, JA) 含量较高 (图 3L)。

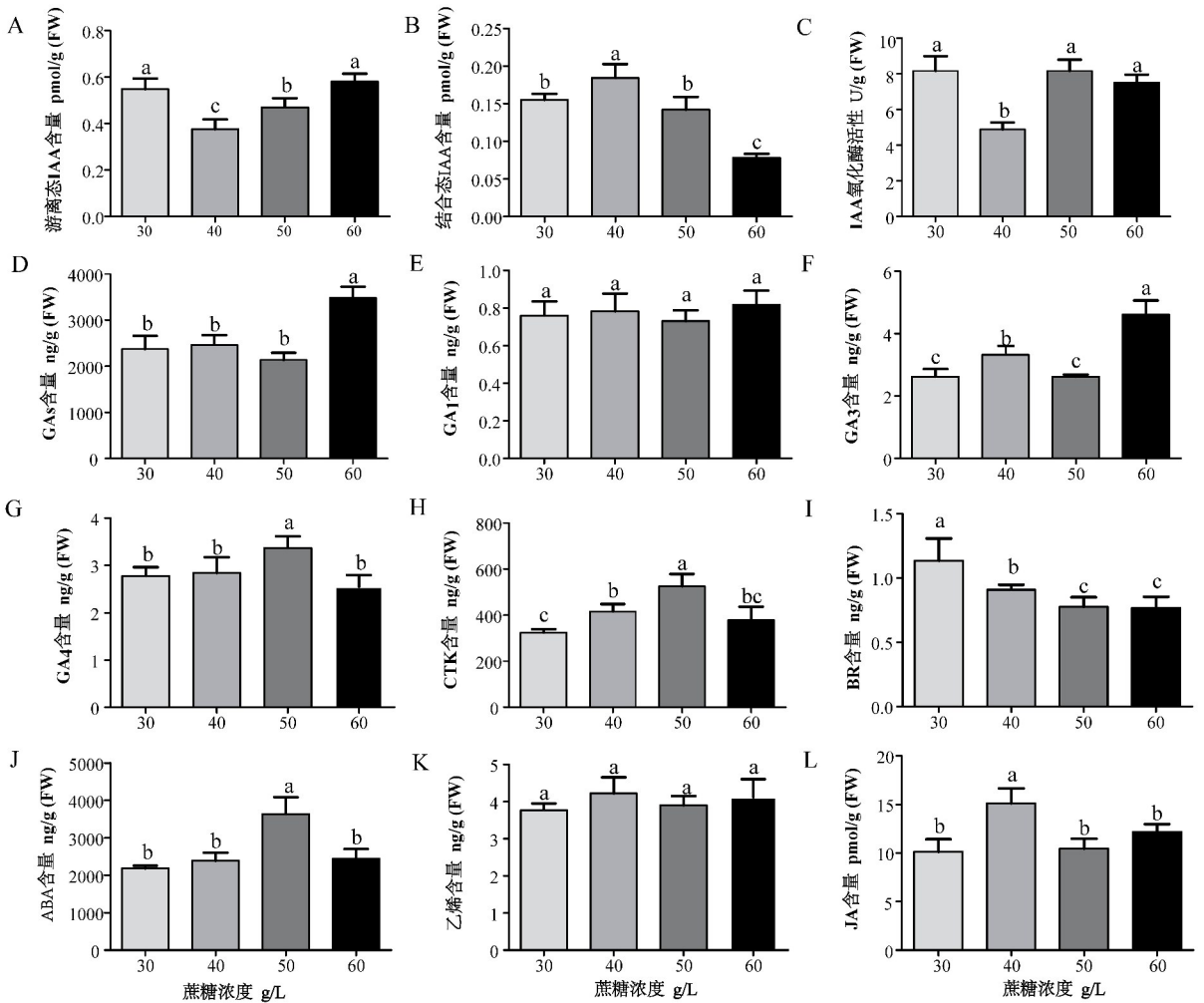


图 3 不同蔗糖浓度对体胚成熟诱导内源激素代谢的影响

注:A 为游离态 IAA 含量,B 为结合态 IAA 含量,C 为 IAA 氧化酶活性,D 为 GAs 含量,E 为 GA_1 含量,F 为 GA_3 含量,G 为 GA_4 含量,H 为 CTK 含量,I 为 BR 含量,J 为 ABA 含量,K 为乙烯含量,L 为茉莉酸含量, $n=3$,不同小写字母表示差异显著 ($P<0.05$)。

Fig. 3 Effects of sucrose concentration on endogenous hormone metabolism during somatic embryo mature induction stage

2.4 蔗糖浓度对体胚成熟诱导氧化胁迫平衡的影响

如图 4 所示, 在体胚发生阶段, 不同蔗糖浓度对活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 活性、 H_2O_2 及 $\cdot OH$ 含量的调节不显著, 但 H_2O_2 含量呈现单峰曲线变化规律, 与体胚发生数量趋势较为一致 (图 4A、图 4B、图 4C)。通过增加蔗糖用量, 可导致 POD 活性显著增强, 而 CAT 活性减弱, 其

中在 40 g/L、50 g/L 蔗糖处理下, POD 活性分别比 30 g/L 显著增加了 30.57% 和 35.62%, CAT 活性则降低了 9.95% 和 34.50% ($P<0.05$, 图 4D、图 4E)。通过增加蔗糖浓度, SOD 活性有所下降, 其中在 40 g/L、60 g/L 蔗糖处理下, SOD 活性分别比 30 g/L 显著降低了 20.99% 和 41.41% ($P<0.05$, 图 4F)。

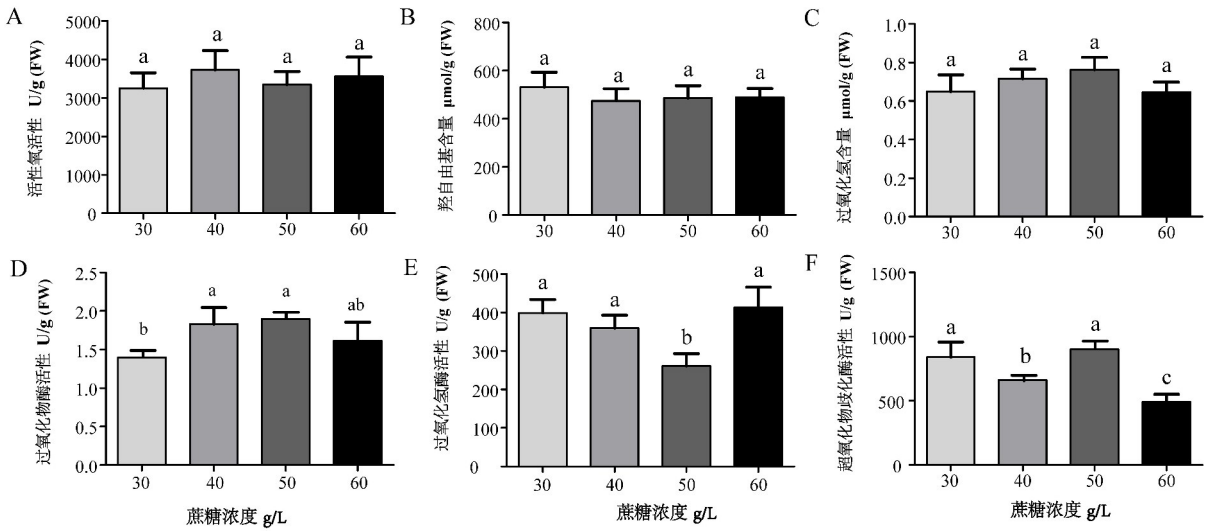


图4 不同蔗糖浓度对体胚成熟诱导活性氧及保护酶的影响

注:A为活性氧活性,B为羟自由基含量,C为过氧化氢含量,D为过氧化物酶活性,E为过氧化氢酶活性,F为超氧化物歧化酶活性, $n=3$,不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

Fig. 4 Effects of sucrose concentration on reactive oxygen species and protective enzyme during somatic embryo mature induction stage

2.5 相关性分析

为进一步分析蔗糖浓度对相关生理指标的影响,以及生理指标对成熟胚诱导的调节效果,将蔗糖浓

度、成熟胚数量及生理指标进行相关性分析,结果见表1。因指标较多,仅显示生理指标与成胚数量相关性较强的系数(Pearson 相关系数 >0.640)。

表1 体胚成熟诱导阶段蔗糖浓度、成胚数量与生理指标的相关性分析

Tab. 1 Correlation analyses of sucrose concentration, embryo number and physiological index in somatic embryo mature induction stage

	蔗糖含量	数量	自由态 IAA	结合态 IAA	赤霉素	赤霉素 A ₃	油菜素	葡萄糖	总糖	淀粉
蔗糖含量	1.000	-0.860	0.267	-0.787	0.652	0.723	0.929	0.909	-0.721	-0.642
数量		1.000	-0.716	0.977*	-0.708	-0.649	0.642	-0.909	0.973*	0.769
自由态 IAA			1.000	-0.798	0.558	0.350	0.075	0.532	-0.857	-0.478
结合态 IAA				1.000	-0.813	-0.727	0.513	-0.924	0.982*	0.638
赤霉素					1.000	0.969*	-0.369	0.899	-0.697	-0.095
赤霉素 A ₃						1.000	-0.510	0.901	-0.584	-0.048
油菜素							1.000	-0.697	0.450	0.601
葡萄糖								1.000	-0.841	-0.477
总糖									1.000	0.733
淀粉										1.000

注: *表示显著相关(双侧, $P < 0.05$)。

结果表明,体胚诱导阶段,蔗糖添加浓度对成胚数量具有影响,且对生理指标具有不同程度的调节,同时激素和糖代谢之间可能存在互作(表1)。蔗糖含量与成胚数量相关系数为-0.860,呈较强的负相关。结合态 IAA 含量与成胚数量达到 0.977 的显著相关水平 ($P < 0.05$)。GA 对体胚发生的影响主要表现为负调控,其中 GA、GA₃ 与成胚数量 Pearson 相关性系数分别为-0.708、-0.649。蔗糖浓度与葡萄糖含量的相关性系数 0.909,而葡萄糖

含量与成胚数为显著负相关(Pearson 相关系数-0.909, $P < 0.05$)。总糖含量对成胚数量有显著调节, Pearson 相关系数高达 0.973 ($P < 0.05$),淀粉含量与胚状体数量相关性系数为 0.769。结合态 IAA 与总糖的相关性系数为 0.982,为显著正相关 ($P < 0.05$)。体胚诱导阶段相关性分析结果表明, IAA、GA 可能是调控百子莲体胚发育成熟的主要激素种类,而淀粉、总糖含量较高时,胚状体数量则较多。

2.6 生理指标验证

经验证, IAA、GA、ABA 以及碳源对百子莲成熟胚诱导具有显著影响, 与前期分析结果基本一致(图5)。加入 PIC 导致体胚诱导失败, 细胞团基本保持为 EC 继代状态, 而生长素极性运输抑制剂 NPA 通过抑制生长素信号, 导致胚状体数量减少, 表明生长素信号对成熟胚诱导具有关键调节作用。添加外源 GA 小幅降低了成胚数, 体胚发育同步化较差; 而通过施用 GA 合成抑制剂 PBZ 抑制 GA 信号, 胚状体数量比对照显著增加 53.95% ($P < 0.05$), 且诱导的球形胚颜色鲜亮。ABA 对成熟胚诱导具有显著的促进作用, 成熟胚数量比对照显著增加 115.61% ($P < 0.05$)。蔗糖对体胚诱导的效果优于葡萄糖和麦芽糖, 表明蔗糖是百子莲成熟胚诱导的较佳碳源。

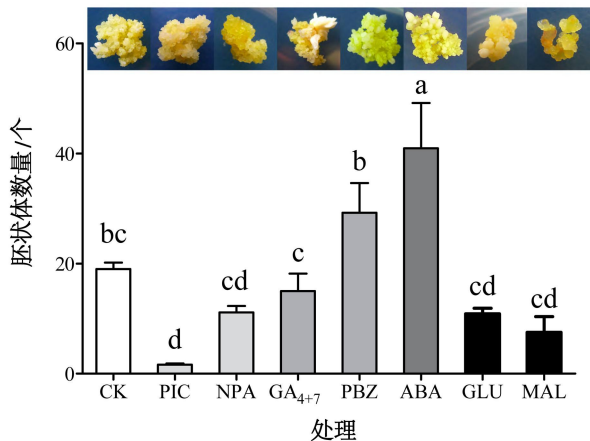


图5 体胚成熟诱导阶段生理指标的验证

注: CK 为对照, PIC 为 1.0 mg/L PIC 处理, NPA 为 1.0 mg/L NPA 处理, GA₄₊₇ 为 0.05 mg/L GA₄₊₇ 处理, PBZ 为 0.05 mg/L PBZ 处理, ABA 为 1.0 mg/L ABA 处理, GLU 为 40 g/L 葡萄糖处理, MAL 为 40 g/L 麦芽糖处理, $n=4$, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Fig. 5 Verification of physiological indicators in somatic embryo mature induction stage

3 讨论与结论

3.1 讨论

3.1.1 蔗糖是调节植物体胚成熟诱导的重要因子

蔗糖是植物组织培养中最常用的碳源^[24], 除作为能源外, 还可作为渗透调节剂调节细胞发育进程^[25], 影响体细胞胚的发育或成熟^[26]。与前期百子莲 3% 蔗糖用量相比, 随浓度升高至 4%, 成熟胚数量有一定提升, 而超过 5% 的蔗糖浓度抑制成熟胚诱导, 这一先升后降的规律与许多植物相似, 表明各物种体胚发生较佳的碳源用量相对稳定。而

不同物种体胚发生最适的蔗糖浓度存在差异, 例如铁皮石斛 (*Dendrobium officinale*) 较佳蔗糖用量为 5%^[10], 荔枝 (*Litchi chinensis*) 为 6%^[26], 水曲柳 (*Fraxinus mandshurica*) 为 7%^[24], 而康乃馨 (*Dianthus caryophyllus*) 则高达 12%^[25]。除了物种差异, 发育阶段对蔗糖用量需求也存在较大差异, 而渗透压的影响在发育阶段的差异中可能更加重要, 因为原胚通常被高渗溶液包围, 幼胚阶段需要碳源可达 8%~12%, 而成熟胚在含有 2% 蔗糖的培养基中就能生长良好^[24]。

3.1.2 糖代谢有效调节体胚成熟诱导

蔗糖作为碳源, 在体胚发育过程中作为外部因素调节胞内总糖、淀粉以及糖组分代谢, 进而影响体胚发生效果。植物胞内淀粉及糖组分在中性转化酶、酸性转化酶、蔗糖合酶与淀粉酶作用下相互转化, 从而调节植物发育^[26]。通常淀粉会转化为蔗糖, 蔗糖进一步分解为葡萄糖和果糖用于细胞生命活动, 富余的单糖重新合成蔗糖和淀粉^[26]。本研究中, 组织内总糖含量与胚状体数量显著相关 (Pearson 相关系数 0.973, $P < 0.05$), 淀粉为主要的储能多糖, 与总糖、麦芽糖等碳源含量变化趋势一致, 而内、外源蔗糖含量存在相反的变化趋势, 表明 EC 细胞糖源较为充足, 体胚成熟发育能量主要来自 EC 细胞, 细胞学观察显示, 百子莲 EC 细胞充斥着大量的淀粉粒, 为胚胎发育成熟储备了充足的能量。在胡萝卜 (*Daucus carota*)^[27]、蝴蝶兰 (*Phalaenopsis aphrodite*)^[28] 胚性细胞中也能观察到大量淀粉粒的富集, 而随着胚胎发育进程, 淀粉粒逐渐减少, 淀粉粒的积累, 为启动胚性细胞分裂、促进体细胞胚的萌发作能量准备。以上研究表明, 淀粉可能是体胚成熟诱导的主要能量来源, 而培养基碳源更多用于渗透压维持。葡萄糖含量随蔗糖浓度增加而升高, 胚状体数量则减少, 表明组织内葡萄糖较为富余, 未被有效利用, 不能促进胚胎成熟发育。在栓皮栎 (*Quercus variabilis*) 体胚发生中, 葡萄糖作为碳源不利于体胚发育^[29]。

3.1.3 内源激素显著调节体胚成熟诱导

激素在离体培养中发挥决定性的作用。本研究结果表明生长素、赤霉素、ABA 等在百子莲体胚成熟诱导中发挥相对重要的作用。生长素具有促进离体细胞和组织生长的特性, 也是影响体胚发生效果的重要激素种类^[30]。内源 IAA 对体胚发生的调控作用十分关键^[31], 可通过调控细胞的极性结构, 显著影响体胚诱导数量, 而随着胚胎发育成熟, 自

由态 IAA 含量降低, 而结合态 IAA 增加^[32-33]。本研究中成熟胚数量与结合态 IAA 显著正相关 (Pearson 相关系数 0.977, $P < 0.05$), 而与自由态 IAA 含量负相关 (Pearson 相关系数 -0.716), 内源 IAA 含量显著影响成熟胚诱导效果^[30,34]。GA 对体胚发生的效果因物种而异, 多数研究表明 GA 对 SE 诱导不利^[35-36], 也有研究报道 10 $\mu\text{mol/L}$ GA₃ 促进印度娃儿藤 (*Tylophora indica*) 体胚诱导数量^[37]。本研究中内源 GAs、GA₃ 与成胚数呈现负相关关系。GA₁ 和 GA₄ 是植物主要活性内源 GAs, 本研究中 GA₄ 呈单峰曲线变化规律, 表明 GA₄ 对百子莲体胚成熟发育具有调控作用, 而前期研究表明 GA₄ 是调节百子莲发育的主要 GAs 组分^[3-4]。ABA 呈现单峰曲线变化, 表明其与百子莲体胚成熟诱导密切相关, 一些研究也证实, 胚胎发育成熟过程中内源 ABA 增加^[33], 而适量外源 ABA 处理可促进体胚成熟诱导^[37]。BR 对体胚发生具有促进作用, 本研究中成熟胚数量与 BR 表现为正相关关系 (Pearson 相关系数 0.642), 与针叶树和水稻 (*Oryza sativa*) 的研究结果一致^[38]。生理测定及验证结果表明, IAA、ABA 利于百子莲体胚诱导, 而 GA 对体胚成熟诱导不利。

3.1.4 适度氧化胁迫利于体胚成熟诱导

离体培养条件下的 SE 过程伴随着胁迫产生, 不适的培养环境可引起 ROS 富集, 最终导致细胞膜透性紊乱致死^[33]。合理的蔗糖浓度维持适度、必要的胁迫, 从而利于细胞全能性的建立^[31]。蔗糖浓度主导的培养基渗透压等胁迫条件对细胞发育过程有重要贡献^[38], 适度胁迫利于体胚发生, 胁迫信号和激素信号、细胞碳水化合物代谢之间存在复杂的平衡关系^[39]。高浓度的 H₂O₂ 会诱发逆境响应激素的积累, 比如 ABA、JA 及乙烯等^[39,41], 而 ABA、JA 等激素可以促进体胚成熟^[33]。高活性的 SOD 与低活性的 CAT 能够形成较高含量的 H₂O₂, 从而促进细胞增殖及体胚发育^[39,42], 例如枸杞 (*Lycium barbarum*) 体胚发生过程中 SOD 活性上升, 可促进早期胚胎发育^[43]。本研究中 H₂O₂ 含量、POD 活性呈单峰曲线变化, 与体胚发生效果的相关性较强, 与 Sauer (2001)、刘福平 (2009) 的报道基本一致^[42,44]。

3.2 结论

百子莲体胚成熟诱导的较佳蔗糖浓度为 40 g/L。培养基中的蔗糖主要用于渗透压的维持, 淀粉含量对体胚诱导至关重要。内源 IAA 含量显著

影响体胚诱导, 较高的结合态 IAA, 较低的自由态 IAA 含量利于体胚发育成熟。内、外源 ABA 增加均利于体胚发育成熟, 而 GAs、GA₃ 含量增高不利于体胚成熟诱导; 中等强度下的 ROS 及保护酶活性利于体胚成熟诱导。

参考文献:

- [1] 陈香波, 陆亮, 钱又宇, 等. 百子莲属种质资源及园林开发应用[J]. 中国园林, 2016, 32(8): 99-105.
- [2] 张伟艳. 百子莲属种子生物学和幼苗生长特性研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [3] Yue J, Zhang D, Ren L, et al. Gibberellin and auxin signals control scape cell elongation and proliferation in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* [J]. Journal of Plant Biology, 2016, 59(4): 358-368.
- [4] Zhang D, Ren L, Yue J, et al. GA₄ and IAA were involved in the morphogenesis and development of flowers in *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* [J]. Journal of Plant Physiology, 2014, 171(11): 966-976.
- [5] Guo H, Guo H, Zhang L, et al. SELTP-assembled battery drives totipotency of somatic plant cell [J]. Plant Biotechnology Journal, 2019, 17(7): 1188-1190.
- [6] Biahoua A, Bonneau L. Control of *in vitro* somatic embryogenesis of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) by the sugar type and the osmotic potential of the culture medium [J]. Plant Cell Reports, 1999, 19(2): 185-190.
- [7] Cangahuala-Inocente G C, Silveira V, Caprestano C A, et al. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana* [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2014, 50(2): 166-175.
- [8] Llpavská H, Konrádová H. Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2004, 40(1): 23-30.
- [9] 胡恒康, 江香梅, 张启香, 等. 碳源对山核桃体细胞胚发生和植株再生的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(6): 911-917.
- [10] 唐静仪. 蔗糖和 ABA 对铁皮石斛体细胞胚胎发生的影响[D]. 成都: 西南交通大学, 2010.
- [11] 张帆, 陈秋逸, 尤玉玲, 等. 百合细胞悬浮体系构建及多糖含量测定的探索[J]. 实验科学与技术, 2018, 16(2): 42-46, 51.
- [12] 王昊, 邓柠檬, 张雅文, 等. 金钗石斛转基因体系的建立[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2019, 51(2): 62-68.
- [13] 张虹. 仙茅组织培养和人工种子研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2017.

- [14]武春燕,潘雨,牛肖翠,等.中间锦鸡儿组织培养体系的建立[J].河北大学学报(自然科学版),2018,38(5):521-525.
- [15]吴丽芳,魏晓梅,陆伟东.白刺花胚性愈伤组织诱导及体细胞胚发生[J].林业科学,2019,55(7):170-177.
- [16]Jéhan H, Courtois D, Ehret C, et al. Plant regeneration of *Iris pallida* Lam. and *Iris germanica* L. via somatic embryogenesis from leaves, apices and young flowers [J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(12):671-675.
- [17]Nakagawa H, Saijyo T, Yamauchi N, et al. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon [J]. Scientia Horticulturae, 2001, 90(1):85-92.
- [18]范现丽.蓝百合快速繁殖技术的研究[D].上海:上海交通大学,2009.
- [19]Suzuki S, Oota M, Nakano M. Embryogenic callus induction from leaf explants of the Liliaceous ornamental plant, *Agapanthus praecox* ssp. *orientalis* (Leighton) Leighton; Histological study and response to selective agents [J]. Scientia Horticulturae, 2002, 95(1):123-132.
- [20]Liu W, Wang C, Shen X, et al. Comparative transcriptome analysis highlights the hormone effects on somatic embryogenesis in *Catalpa bungei* [J]. Plant Reproduction, 2019, 32(2):141-151.
- [21]Capote T, Usié A, Babosa P, et al. Transcriptome dynamics of cork oak (*Quercus suber*) somatic embryogenesis reveals active gene players in transcription regulation and phytohormone homeostasis of embryo development [J]. Tree Genetics & Genomes, 2019, 15(4):52.
- [22]何叶,任丽,孙海龙,等.百子莲愈伤组织诱导体系的优化[J].西南农业学报,2014,27(3):1237-1242.
- [23]Ppadko A G, Litvionvskaya R P, Sauchuk A L, et al. A new ELISA for quantification of brassinosteroids in plants [J]. Steroids, 2015, 97:78-86.
- [24]李楠.水曲柳畸形体胚发生的影响因子研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2009.
- [25]Karami O, Deljou A, Esna-Ashari M, et al. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2006, 110(4):340-344.
- [26]吉训志,李焕苓,王果,等.2个荔枝品种体胚发生过程中糖含量及相关酶活性变化[J].热带作物学报,2019,40(4):675-680.
- [27]周燕.胡萝卜体细胞胚胎发生中的细胞组织化学和蛋白质组成变化[J].植物生理学报,2004,40(2):181-183.
- [28]刘福平,陈移亮.细胞分裂素对蝴蝶兰胚性愈伤组织诱导的影响[J].热带作物学报,2008,27(1):46-50.
- [29]幸福梅.栓皮栎体胚发生生理生化特性的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2007.
- [30]Pasternak T P, Prinsen E, Ayaydin F, et al. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa [J]. Plant Physiology, 2002, 129(4):1807-1819.
- [31]Fehér A, Pasternak T P, Dudits D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state [J]. Plant Cell Tissue & Organ Culture, 2003, 74(3):201-228.
- [32]Purgatto E, Oliveira Do Nascimento J R, Lajolo F M, et al. The onset of starch degradation during banana ripening is concomitant to changes in the content of free and conjugated forms of indole-3-acetic acid [J]. Journal of Plant Physiology, 2002, 159(10):1105-1111.
- [33]Santa-Catarina C, Silveira V, Balbuena T S, et al. IAA, ABA, polyamines and free amino acids associated with zygotic embryo development of *Ocotea catharinensis* [J]. Plant Growth Regulation, 2006, 49(2):237-247.
- [34]Michalczuk L, Cooke T J, Cohen J D. Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis [J]. Phytochemistry, 1992, 31(4):1097-1103.
- [35]Hutchinson M J, Krishnaraj S, Saxena P K. Inhibitory effect of GA₃ on the development of thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium × hortorum* Bailey) hypocotyl cultures [J]. Plant Cell Reports, 1997, 16(6):435-438.
- [36]Mitsubishi W, Toyomasu T, Masui H, et al. Gibberellin is essentially required for carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis: dynamic regulation of gibberellin 3-oxidase gene expressions [J]. Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan, 2003, 67(11):2438-2447.
- [37]Thomas T D. Effect of Sugars, Gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill [J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2006, 22(3):465-471.
- [38]Pullman G S, Zhang Y, Phan B H. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice [J]. Plant Cell Reports, 2003, 22(2):96-104.
- [39]Lipavská H, Konrádová H. Invited review: Somatic embryogenesis in conifers: The role of carbohydrate metabolism [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2004, 40(1):23-30.
- [40]Pasternak T P, Ötvös K, Domoki M, et al. Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin [J]. Plant Growth Regulation, 2007, 51(2):109-117.